

⑪ 公表特許公報 (A)

平4-507043

⑫ 公表 平成4年(1992)12月10日

⑬ Int. Cl. 5 C 12 N 15/49 C 07 K 7/10	識別記号 ZNA	庁内整理番号 8318-4H 8828-4B	審査請求 未請求 予備審査請求 有	部門(区分) 1 (1)
		C 12 N 15/00		A※

(全 15 頁)

⑭ 発明の名称 HIV-1, HIV-2 及び SIV タイプのレトロウイルスのゲノムからのヌクレオチド配列、並びに、特に、これらのレトロウイルスのゲノムの増幅のため及びこれらのウイルスによる感染の「生体外」診断のためのこれらの配列の応用

⑮ 特 願 平2-508911 ⑯ 翻訳文提出日 平3(1991)12月2日
⑯ ⑯ 出 願 平2(1990)6月5日 ⑯ 国際出願 PCT/FR90/00393
⑯ ⑯ 国際公開番号 WO90/15066
⑯ ⑯ 国際公開日 平2(1990)12月13日

優先権主張 ⑯ 1989年6月2日 ⑯ フランス(FR)⑯ 89/07354

⑰ 発明者 モンカニ, モーリス フランス国、エフ-75019 パリ、アレ・デ・オルゲードウーフランドル、18

⑯ 出願人 インスティチュート・バスツー フランス国、エフ-75724 パリ・セデュ・15、リュー・ドウ・ドクトール・ルー、25-28

⑯ 代理人 弁理士 津国 肇 外2名

⑯ 指定国 CA, JP, US

最終頁に続く

請求の範囲

1. - HIV-1 Bru, HIV-1 Ma1, HIV-1 E1i, HIV-2 ROD 及び SIV MAC ウィルスの gag, vpr 及び pol 遺伝子内又は HIV-2 ROD 及び SIV MAC ウィルスの nef2, vif2 及び vpx 遺伝子又は HIV-1 Bru, HIV-1 Ma1 及び HIV-1 E1i ウィルスの env, nef1, vif1 及び vpr 遺伝子内に含まれているヌクレオチド配列のうちの1つの中に含まれている配列の中から選択されていること、

- 又は(特に最も長いリーダーについて)、HIV-1 Bru, 又は HIV-1 Ma1 又は HIV-1 E1i 又は HIV-2 ROD 又は SIV MAC からの前記ヌクレオチド配列のうちの1つを含むか、又は、これらの配列の相補的ヌクレオチド配列を含み、末端3' 又は 5' の側で当該種類のヌクレオチド配列から「はみ出す」相補的ヌクレオチドがある場合それらは好ましくは上記 HIV-1, HIV-2 又は SIV MAC タイプのウィルスの完全配列自体の中に相応する末端3' 又は 5' の手前に置かれているものと一致すること、

- 又はこのリーダーの配列が上述のヌクレオチド配列の1つと同一でない場合又はこれらの配列の1つと相補的でない場合、それでも HIV-1 Bru, HIV-1 Ma1, HIV-1 E1i ウィルスからの核配列と及び/又は上述の HIV-2 ROD 又は SIV MAC ウィルスからのヌクレオチド配列と雜種形成する可能性があること、

を特徴とするヌクレオチド配列。

2. MMy1: TGG CGC CCG AAC AGG GAC
... .T.
S. 636-653, 635-652, 636-653, 859-876,
834-851
MMy2: GGC CAG GGG GAA AGA AAA A
... .C. .C.
... .A.
S. 854-872, 864-888, 848-872, 1160-1184,
1124-1148
MMy3: TGC CCA TAC AAA ATG TTT TA
... .C. .T.T
AS. 900-881, 916-897, 900-881, 1212-1193,
1176-1157
MMy4: TGC ATG GCT GCT TGA TG
... .A.C. .G. .
AS. 1385-1369, 1419-1403, 1386-1369, 1703-1687,
1667-1651
MMy4B: CTT TGC ATG GCT GCT TGA TG
... .C.A.C. .G. .
AS. 1388-1369, 1421-1403, 1388-1369, 1706-1687,
1670-1651
MMy4Bb: CAT CAA GCA GCC ATG CAA AG
... .C. .G.T.G. .

特表平4-507043 (3)

S, 7360-7384, 7349-7373, 7306-7330
 MMY7bis: AAT TTC TGG GTC CCC TCC TGA GGA T
 AS, 7384-7360, 7373-7349, 7330-7306
 MMY8: GTG CTT CCT GCT GCT CCC AAG AAC CC
 AS, 7857-7832, 7846-7821, 7800-7775
 MMY8bis: GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC AC
 S, 7832-7857, 7821-7846, 7775-7800.
 MMY9: ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA AGT AG
 A
 S, 8844-8869, 8836-8861, 8787-8812,
 MMY9bis: CTA CTT TTT GAC CAC TTG CCA CCC AT
 AS, 8869-8844, 8861-8836, 8812-8787.
 MMY10: TAT TAA CAA GAG ATG GTG G
 S, 7629-7647, 7612-7630, 7572-7590,
 MMY11: CCA GCA AGA AAA GAA TGA A
 S, 8224-8242, 8213-8231, 8167-8185,
 MMY12: TTC ATT CTT TTC TTG CTG G
 AS, 8242-8224, 8231-8213, 8185-8167.
 というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 B_ru、
 HIV-1 Ma1及びHIV-1 E1iウイルスのenv遺伝子内に含まれている請求の範囲第1項に記載の配列。
 9. MMY10: AAA AGA AAA GGG GGG ACT GGA
 S, 9116-9136, 9117-9137, 9062-9082,
 MMY10bis: TCC AGT CCC CCC TTT TCT TTT
 MMY11: AAA GTC CCC AGC GGA AAG TCC C
 AS, 9503-9483, 9505-9484, 9449-9428,
 というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 B_ru、
 HIV-1 Ma1及びHIV-1 E1iウイルスのnef1遺伝子内に含まれている請求の範囲第1項に記載の配列。
 10. MMY15: GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT GAT
 S, 5073-5099, 5068-5094, 5037-5063,
 MMY16: GCA GAC CAA CTA ATT CAT CTG TA
 S, 5383-5405, 5378-5400, 5347-5369,
 MMY16bis: TAC AGA TGA ATT AGT TGG TCT GC
 AS, 5405-5383, 5400-5378, 5369-5347.
 MMY17: CTT AAG CTC CTC TAA AAG CTC TA
 AS, 5675-5653, 5670-5648, 5639-5617,
 というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 B_ru、
 HIV-1 Ma1及びHIV-1 E1iウイルスのvif1遺伝子内に含まれている請求の範囲第1項に記載の配列。
 11. MMY25: GCA AGT AGT ACA TGT AAT GCA ACC T
 S, 6081-6105, 6076-6100, 6045-6069,
 MMY26: AGC AGA AGA CAG TGG CCA TGA GAG
 S, 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230,
 MMY27: ACT ACA GAT CAT CAA TAT CCC AA
 AS, 6343-6321, 6338-6316, 6307-6285.
 というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 B_ru、

HIV-1 Ma1, HIV-1 E1i, HIV-2 ROD及びSIV-MACウイルスのvp1遺伝子内に含まれている請求の範囲第1項に記載の配列。

12. 生物学的試料に基づいて行なわれるHIV-1及び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスの核配列の遺伝子增幅方法において、主として、

- 上述の生物学的試料の中に場合によって存在するHIV-1、HIV-2又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する検出すべき核酸の抽出段階、及び場合によってはこの核酸がRNAの形をしている場合のこの核酸の逆トランスクリプターゼ（逆転写酵素）を用いた処理段階、
- 一本鎖核酸の形成に導く、検出すべき2本鎖核酸の変性の段階、
- 少なくとも1つの上記リーダ対と上記鎖を接触させることによる請求の範囲第1項乃至第11項のいずれかに記載の少なくとも1つのリーダと、上記変性段階の際に得られた核酸鎖の各々との雜種形成の段階、
- 1つのDNAポリメラーゼと異なる4つのヌクレオシド三リン酸(dNTP)の存在する中でリーダが上で雜種形成されるような鎖と相補性をもつDNAを、これらのリーダから形成し、かくして先行する変性段階に比べさらに多くの二本鎖核酸の形成がもたらされる段階

を含み、かつ場合によって生物学的試料の中にその検出を可能にするだけ充分な割合で存在する検出すべき前記核配列を得るため規定

の回数だけくり返されるようなサイクル、

- 生物学的試料内にHIV-1及び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する核酸が場合によって存在することを検出する段階、を含む方法。

13. ウイルスDNAの抽出段階には、

- ポック大ピストン内で熱分解された0.5mlの水の中での細胞沈渣の懸濁段階、
- いわゆる「往復運動による」細胞の粉砕段階、
- 最終濃度が0.1%になるような、1対100×トリトンの付加段階、
- 100℃で15分乃至25分間の熱による変性段階、
- 細胞残渣のみを除去するための短い遠心分離段階、
- 無水エタノール2.5体積と最終体積の10%の3モルの酢酸ナトリウムの付加による-20℃での一晩中のDNAの沈殿段階、

が含まれることを特徴とする、請求の範囲第12項に記載の方法。

14. ウイルスのRNAの逆転写段階には、

- 水中に再懸濁された抽出RNA1.0μlを最終体積4.0μl内で各々0.8μMの濃度でリーダ対の存在する中に置き、この全体を10分間100℃で変性し次に氷水の中に沈める段階、
- 5μlの「10×バッファ」の緩衝液(1/10⁴に希釈されたときトリス-HCl、pH=8.9: 50mM; (NH₄)₂SO₄:

15 mM: MgCl₂; 5 mM: β-メルカブト-エタノール; 10 mM: ゼラチン; 0.25 mg/ml (を含む) + 1 単位の逆トランスクリプターゼ + 1 単位のTaq-ポリメラーゼ + 各 2.5 mM の 4 つの dNTP の混合物 1 μl + Q. S. P. 水 1.0 μl の混合物 1.0 μl を再び加え (なお cDNA の製造は 13 分間 42 °C で逆トランスクリプターゼの作用により行なわれる)、次に 3 分間 95 °C に加熱して逆トランスクリプターゼを破壊する段階。

が含まれることを特徴とする、請求の範囲第 13 項に記載の方法。

15. 変性段階が、単数又は複数の請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれかに記載のリーダ対の存在する中で行なわれることを特徴とする、請求の範囲第 12 項乃至第 14 項のいずれか 1 項に記載の方法。

16. - 雜種形成: 変性 - 再会合の第 1 段階のためプライマー (各プライマー 4.0 μM の溶液 1 μl) を DNA マトリクス (1.00 ~ 3.00 ng) が存在する中に置く; 10 分間 100 °C で加熱しこの DNA - マトリクスとプライマの混合物を含む試験管を氷を含んだ水の中に沈める。これらのプライマは、0.8 μM という次に続く増幅段階における最終濃度で使用されなくてはならない。

- 増幅: 前記媒質内に、各々最終溶液 (5.0 μl) 中で 0.5 μM で使用される 4 つの dNTP と、5.0 μl の反応媒質に対し 1 単位のTaq-ポリメラーゼを付加する; この段階は、「10 × バッファ」の名で呼ばれる請求の範囲第 14 項に組成が

示されている増幅緩衝液の中で行なわれる。

という条件の下で実施されることを特徴とする、請求の範囲第 15 項に記載の方法。

17. HIV-1 及び / 又は HIV-2 タイプのウイルスによるヒトの感染又は 3 つのウイルス (HIV-1, HIV-2, SIV) の 1 つ以上による動物の感染の 生体外 診断への、請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法の応用。

18. HIV 又は SIV タイプのウイルスのゲノムのヌクレオチド配列の増幅とそれに続く、請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれか 1 項に記載のヌクレオチドリーダーからこれらの増幅された配列をタンパク質に翻訳する作業への、請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法の応用。

19. 請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれか 1 項に記載の核配列の単数 (又は複数) の翻訳生成物及び / 又は請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法により増幅されたヌクレオチド配列の単数 (又は複数) の翻訳生成物を含む免疫原化合物。

20. MMy4Bbis-MMy28bis, MMy26-MMy5bis, MMy8bis-MMy89, MMy8bis-MMy9bis, MMy25-MMy27, MMy26-MMy27, MMy28-MMy29bis, MMy29-MMy30bis, MMy30-MMy31bis, MMy31-MMy32bis, といった、請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法の利用のためのオリゴヌクレオチドリーダ対。

21. - 請求の範囲第 1 項乃至第 11 項又は第 20 項のいずれか 1 項に記載の、少なくとも 1 対のオリゴヌクレオチドリーダ

対。

- 特に DNA ポリメラーゼと 4 つの異なる三リン酸ヌクレオチドの増幅作業サイクルの実施に適した試薬、
- 請求の範囲第 14 項に記されているような「10 × バッファ」緩衝液、
- 検出すべき増幅された単数 (又は複数) の核酸配列と雑種形成することのできる、標識づけ可能な単数 (又は複数) のプローブ、を含む、請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法の使用のためのキット。

22. 通常的に受容可能な試形剤と結びつけた状態で請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれか 1 項に記載のアンチセンスヌクレオチド配列を少なくとも 1 つ含む、ウイルス性疾患特にエイズの治療のための組成物。

23. 請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれか 1 項に記載の核配列の翻訳生成物及び / 又は請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法により増幅されたヌクレオチド配列の単数 (又は複数) の翻訳生成物と免疫反応を起こす可能性のある抗体。

24. 請求の範囲第 23 項に記載の抗体と研究対象の患者から採取した生物学的試料 (特に血清) との接触、及び場合によってこの生物学的試料の中に存在する HIV 又は SIV タイプのウイルスの抗原と前記抗体の間で形成された免疫学的複合体の検出を含む、3 つのウイルス (HIV-1, HIV-2, SIV) のうちの少なくとも 1 つによる動物の感染又は HIV-1 及び / 又は HIV-2 タイ

プのウイルスによるヒトの感染を「生体外」で診断する方法。

25. 請求の範囲第 23 項に記載の抗体及び場合によってはこれらの抗体と HIV 及び / 又は SIV ウィルスの抗原の間で起こった免疫学的反応を実証するのに適した試薬を含む、請求の範囲第 24 項に記載の方法の使用のためのキット。

26. 1 / 10 に希釈されたとき、

- トリス-HCl, pH 8.9; 50 mM;
- (NH₄)₂SO₄; 1.5 M
- MgCl₂; 5 mM
- β-メルカブト-エタノール; 1.0 mM
- ゼラチン; 0.25 mg/ml

を含むことを特徴とする、請求の範囲第 12 項に記載の方法の雑種形成段階又は請求の範囲第 14 項に記載の方法のウイルス RNA の逆転写段階において使用可能な緩衝液溶液 (「10 × バッファ」)。

明細書

HIV-1、HIV-2及びSIVタイプのレトロウイルスのゲノムからのタクレオチド配列、並びに、特に、これらのレトロウイルスのゲノムの増幅のため及びこれらのウイルスによる感染の「生体外」診断のためのこれらの配列の応用

本発明は、HIVタイプのヒト免疫不全レトロウイルス又はSIVタイプのサル免疫不全レトロウイルスに特異な核配列の増幅技術の使用のために用いることができるオリゴタクレオチド配列に関する。

本発明は特に、HIV(現在HIV-1及び/又はHIV-2)タイプのレトロウイルスによるヒトの感染についての人間の生体外(*in vitro*)診断方法としてこれらの配列を応用することに関する。

HIV-1及びHIV-2という呼称でまとめられるレトロウイルスの分離及び特徴づけは、それぞれ欧州特許出願明細書第85/905.513.9号及び第87/400.151.4号の中で記述されている。これらのレトロウイルスは、リンパ節疾患又は後天性免疫不全症候群(エイズ)の症状を示す複数の患者において分離された。

HIV-2タイプのレトロウイルスは、HIV-1タイプのレトロウイルスと同様、ヒトT4リンパ球に対する向性及び増殖した場合のこれらのリンパ球に対する細胞変性効果ひいては中でも全身性で持続性の多発腫瘍症なわちエイズをひき起こす効果によって特徴づけされる。

それまでのSTLV-IIIという名称に代わってSIV-1とい

同様にして、クラスHIV-1を代表するレトロウイルスのcDNAの完全なタクレオチド配列は、WAIN HOBSON, SONIGO, COLE, DANOS及びALIZONによりCELL(1985年1月)の中に記述されている。

同様に言葉の便宜上、HIV-1及びHIV-2タイプのウイルスは以下時としてHIVという表現で呼ばれる。

現在存在するHIV-1又はHIV-2タイプのウイルスによる感染の「生体外」診断方法は、例えば抗体と抽出物又は抗原の場合によって発生する免疫反応の生成を可能にする条件の下でHIV-1又はHIV-2の抗原又は抽出物と生物学的流体を接触させることによる、研究対象の患者から得られた血清中などの生物学的流体中又は生物学的採取物中に場合によって存在する抗体ANTI-HIV-1又はANTI-HIV-2の検出(生検)を利用する。

このような診断方法は、特にHIVタイプのウイルスにヒトが最近感染した場合には、誤って陰性となる危険性をはらんでいる。

遺伝子増幅技術は、特にウイルス性疾患に敏感な生体外診断方法の完成にとって著しく助けとなるものである。これらの遺伝子増幅技術としては、欧州特許出願明細書1986年3月27日付の第86/302.298.4号及び1987年1月9日付の第87/300.203.4号の中に記述されているようなPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)技術、或いはまたBiotechnology第6巻p197(1988年10月)に記述されているいわゆる

う名称で呼ばれているもう1つのレトロウイルスはアカゲザルにおいて分離された(M.D. DANIEL他、Science、228、1201(1985年); N.L. LETWIN他、Science、230, 71(1985年)、「STLV-III」との呼称で)。

「STLV-III」と(又はSIV)と呼ばれるもう1つのレトロウイルスは、野生のサバンサモンキーにおいて分離された。しかし、アカゲザルに存在するウイルスとは異なり、STLV-IIIの存在は、アフリカのサバンサモンキーにおいてエイズタイプの疾患を誘発しないように思われる。

言葉の便宜上、以下においては、これらのウイルスは、SIVという表現(SIVという表現は「Simian Immunodeficiency Virus」(サルの免疫不全症ウイルス)という英語の略語である)と場合によってそれに続くこれらウイルスが出てきたサルの種を表す略語なわちアカゲザル(macaque)に対する「MAC」又はアフリカサバンサモンキーに対する「AGM」(「African Green Monkey」の略)でのみ呼ばれる。

レトロウイルスSIV-1 Macの菌株は1986年2月7日にI-521という番号でC. N. C. M. に寄託された。

レトロウイルスHIV-1及びHIV-2の研究を続行するにつれて、そのゲノムのRNAの相補的DNA(cDNA)の配列を得ることもできた。HIV-2クラスを代表するレトロウイルスのcDNAの完全なタクレオチド配列(HIV-2, ROD)は、1986年2月21日、照会名LAV-2 RODでI-522としてC. N. C. M. に寄託された。

「QBレプリカーゼ」技術、及び国際特許出願明細書第W089/01050号に記述されているRNAポリメラーゼ(T7RNAポリメラーゼ)を用いて行なう技術、を挙げることができる。これらの技術は、ウイルスの核酸の検出感度を改善できるようにし、特異的合成リーダの使用を必要とする。

HIVタイプのウイルスの研究に関しては、リーダ(先導配列)の選択に問題が多い。実際、ウイルス性ゲノムのタクレオチド配列はきわめて可変的であることから、HIVタイプのウイルスの一定の与えられた隔離集団の既知の配列に適合するリーダは、HIVタイプのいくつかの変型ウイルスの増幅を起こしそうになる可能性がある。一方、1つのHIVウイルスからもう1つのHIVウイルスへと保存されたゲノム領域の中でリーダが選択された場合、その「良好な機能」はそれだからといって保証されているわけではなく、増幅収量不良をひき起こす可能性がある。

本発明はまさに、なかでも、現在の技術状態では最大と考えられる収量で特に数多くの、非特異性帯域の存在を避けるような、HIV及びSIVタイプの全てのウイルスのゲノムの特に診断を目的とした増幅を可能とするオリゴタクレオチドリーダを提供する。

本発明のリーダは、HIV-1群のウイルス及び/又はHIV-2及びSIV群のウイルスに同時に特異的であり、これらのウイルスのゲノムの変異に対する感受性をもたない。

本発明の目的は、HIV-1タイプ及び/又はHIV-2及びSIVタイプのウイルスのゲノム増幅のために使用することができ

る約15個乃至30個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドリーダーにある。

本発明は、

- HIV-1 Bru, HIV-1 Ma1, HIV-1 E1i, HIV-2 ROD及びSIV MACウイルスのgag, vpr及びpol遺伝子内又はHIV-2 ROD及びSIV MACウイルスのnef2, vif2及びvpx遺伝子又はHIV-1 Bru, HIV-1 Ma1及びHIV-1 E1iウイルスのenv, nef1, vif1及びvpr遺伝子内に含まれているヌクレオチド配列のうちの1つの中に含まれている配列の中から、より限定的には以下に規定するヌクレオチド連鎖の中に含まれている配列の中から選ばれること、
- 又は、(特に最も長い配列について)、HIV-1 Bru、又はHIV-1 Ma1又はHIV-1 E1i又はHIV-2 ROD又はSIV MACからの前記ヌクレオチド配列のうちの1つを含むか、又はこれらの配列の相補的ヌクレオチド配列を含み、末端3'又は5'の側で当該種類のヌクレオチド配列から「はみ出す」相補的ヌクレオチドがある場合それらは好ましくは上記HIV-1, HIV-2又はSIV MACタイプのウイルスの完全配列自体の中に相応する末端5'又は3'の手前に置かれているものと一致すること、
- 又はこのヌクレオチド配列が上述のヌクレオチド配列の1つと同一でない場合又はこれらの配列の1つと相補的でない場合、それでもHIV-1 Bru, HIV-1 Ma1, HIV-1

-1 Bru, HIV-1 Ma1, HIV-1 E1i, HIV-2 ROD及びSIVに相応するゲノム上のヌクレオチドの位置を示す) :

・ 上述のウイルスのゲノムのgag遺伝子の特異的配列(これらのウイルスの核様体の特異的抗原群についてコード化する遺伝子)。

HIV及び/又はSIVタイプのウイルスの遺伝子とこれらのヌクレオチド配列の雑種形成特性に影響を及ぼすことなく、下記ヌクレオチド配列のいくつかの位置に対しいくつかの変異型を加えることも可能である。これらの変異型を含むヌクレオチド配列は、単数又は複数の塩基の置換によってそれが誘導された元のヌクレオチド配列の下に表示されている。元のヌクレオチド配列の塩基との関係において変更された塩基は、これらの元の配列内の置換された塩基に相応する位置に垂直に略さずに示されている:一方これらの変異型を有する配列内の置換されなかった元の配列の塩基は点線を用いて示されている。

リーダの合成は、すべての変異型を同時に用いることにより行われる。テストにおいて用いられるのは、1つの与えられた配列に対する全ての変異型の混合である。

MMy1: TGG CGC CCG AAC AGG GAC

... .T.

S. 636-653, 635-652, 636-653, 859-876, 834-851

MMy2: GGC CAG GGG GAA AGA AAA A

... .C. .C.

E1iウイルスからのヌクレオチド配列と及び/又は上述のHIV-2 ROD又はSIV MACウイルスからのヌクレオチド配列と雑種形成する可能性があること

を特徴とするあらゆるヌクレオチド配列に関する。雑種形成(ハイブリッド形成)は、最適な収量を得るのに推奨される60°C±1°C(好ましくは60°C±0.5°C)の温度で行なうことができる。

上述のヌクレオチドの番号づけは、「Los Alamos国立研究所-米国ニューメキシコ州」により編集された「ヒトレトロウイルスとエイズ-1989年」という参照マニュアルの中で用いられているものと一致する。(HIV-1 Ma1, HIV-1 E1iウイルスの配列については、1986年6月23日付の欧州特許出願明細書第86.401380号の中でMONTAGNIER, SONIGO, WAIN-HOBSON及びALIZONにより記述された)。

本発明の配列は、Applied Biosystemsにより市販されている合成装置(リン酸-アミノ酸塩法)又はその他の類似の方法を用いるあらゆる装置で合成される。

本発明はさらに限定的に言うと、以下のヌクレオチド連鎖を特徴とするオリゴヌクレオチド配列に関する(なおこれらの連鎖は5'→3'の方向に示され、頭文字「S」及び「AS」はオリゴヌクレオチドがセンスか又はアンチセンスかすなわちそのオリゴヌクレオチドがそれぞれ5'→3'の方向又は3'→5'の方向に向けられているかを示している) :

1) HIV-1, HIV-2及びSIVウイルスのゲノムに共通の配列(1本の線で間隔とりされた一連の数字は、それぞれHIV

... .A.

S. 854-872, 864-888, 848-872, 1160-1184.

1124-1148

MMy3: TGC CCA TAC AAA ATG TTT TA

... .C. .T.T

AS. 900-881, 916-897, 900-881, 1212-1193,

1176-1157

MMy4: TGC ATG GCT GCT TGA TG

... .A. . . . C .G .

AS. 1385-1369, 1419-1403, 1385-1369, 1703-1687,

1667-1651

MMy4B: CTT TGC ATG GCT GCT TGA TG

..C . . . A . . . C .G .

AS. 1388-1369, 1421-1403, 1388-1369, 1706-1687,

1670-1651.

MMy4Bbis: CAT CAA GCA GCC ATG CAA AG

..C .G . . . T . . . G .

S. 1369-1388, 1403-1421, 1369-1388, 1687-1706,

1651-1670.

MMy28: AGG GCT GTT GGA AAT GTG G

... G . .

S. 2021-2039, 2055-2073, 2024-2042, 2329-2349,

2299-2318.

MMy28bis: CCA CAT TTC CAG CAT CCC T

特表平4-507043 (7)

... G
... C
AS. 2039-2021, 2073-2055, 2042-2024, 2349-2329,
2318-2299

· v p r 遺伝子に特異的な配列

MMy18: GAT AGA TGG AAC AAG CCC CAG
S. 5590-5610, 5585-5605, 5554-5574, 6233-6296,
6147-6170.

MMy19: TCC ATT TCT TGC TCT CCT CTG T
AS. 5870-5849, 5865-5844, 5834-5813, 6551-6531,
6454-6431.

· p o 1 遺伝子に特異的な配列

MMy29: TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA
... A
S. 2620-2643, 2615-2638, 2584-2607, 2971-2994,
2887-3010

MMy29bis: TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA
... . T
AS. 2643-2620, 2638-2615, 2607-2584,
2994-2971, 3010-2887.

MMy30: TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AA
... T
S. 3339-3361, 3334-3356, 3303-3325, 3690-3712,
3606-3628.

2) H I V - 2 及び S I V ウィルスのゲノムに共通の配列 (一本の線で間隔とりされた一連の数字は、それぞれ H I V - 2 R O D 及び S I V - M A C に相応するゲノム上のヌクレオチドの位置を示している)。

· n e f 2 遺伝子の特異的配列 (27 kDの陰性因子に対しコード化する)

MMy12: AGA GAC TCT TGC GGG CGC GTG
S. 9165-9185, 9139-9159.

MMy13: ATA TAC TTA GAA AAG GAA GAA GG
S. 9542-9564, 9516-9538.

MMy13bis: CCT TCT TCC TTT TCT AAG TAT AT
AS. 9564-9542, 9538-9516.

MMy14: AGC TGA GAC AGC AGG GAC TTT CCA
AS. 9956-9933, 9893-9870.

· v i f 2 遺伝子の特異的配列 (23 kDの感染力因子についてコード化する)

MMy20: TAT GGA GGA GGA AAA GAG ATG GAT AGT
S. 5424-5450, 5340-5366.

MMy21: TAG CAC TTA TTT CCC TTG CTT T
S. 5754-5775, 5670-5691.

MMy21bis: AAA GCA AGG GAA ATA AGT GCT A
AS. 5775-5754, 5691-5670.

MMy22: CCC TTG TTC ATC ATG CCA GTA T
AS. 6082-6061, 5995-5974.

· v p x 遺伝子の特異的配列 (12 kDのタンパク質についてコード化する)

MMy23: ATG TCA GAT CCC AGG GAG A
S. 5900-5918, 5813-5831.

MMy24: CCT GGA GGG GGA GGA GGA GGA

MMy30bis: TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA
... T
AS. 3361-3339, 3356-3334, 3325-3303,
3712-3690, 3628-3606.

MMy31: CAT GGG TAC CAG CAC ACA AAG G
S. 4186-4207, 4181-4202, 4150-4171, 4534-4555,
4450-4471.

MMy31bis: CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G
AS. 4207-4186, 4202-4181, 4171-4150,
4555-4534, 4471-4450.

MMy32: TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT
... A
S. 4992-5011, 4987-5006, 4956-4975, 5340-5359,
5256-5275.

MMy32bis: ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA
... T
... C
AS. 5011-4992, 5006-4987, 4975-4956,
5359-5340, 5275-5256

3) H I V - 1 B r u, H I V - 1 M a 1 及び H I V - 1 E 1 i ウィルスのゲノムに共通の配列 (1本の線により間隔とりされた一連の数字は、それぞれ H I V - 1 B r u, H I V - 1 M a 1 及び H I V - 1 E 1 i ウィルスに相応するゲノム上のヌクレオチドの位置を示している)。

· e n v 遺伝子の特異的配列 (外被タンパク質に対してコード化する)

MMy5: CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT GCC CC
S. 6905-6930, 6903-6928, 6860-6885

MMy5bis: GGG GCA CAA TAA TGT ATG GGA ATT GG
AS. 6930-6905, 6928-6903, 6885-6860.

MMy6: AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GA
S. 7055-7077, 7053-7075, 7010-7032

MMy7: ATC CTC AGG AGG GGA CCC AGA AAT T
S. 7360-7384, 7349-7373, 7306-7330

MMy7bis: AAT TTC TGG GTC CCC TCC TGA GGA T
AS. 7384-7360, 7373-7349, 7330-7306

MMy8: GTG CTT CCT GCT GCT CCC AAG AAC CC
AS. 7857-7832, 7846-7821, 7800-7775

MMy8bis: GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC AC
S. 7832-7857, 7821-7846, 7775-7800.

MMy9: ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA AGT AG
... A

S. 8844-8869, 8836-8861, 8787-8812.
 MMMy9bis: CTA CTT TTT GAC CAC TTG CCA CCC AT
 AS. 8869-8844, 8861-8836, 8812-8787.
 MMMy78: TAT TAA CAA GAG ATG GTG G
 S. 7629-7647, 7612-7630, 7572-7590.
 MMMy89: CCA GCA AGA AAA GAA TGA A
 S. 8224-8242, 8213-8231, 8167-8185.
 MMMy89bis: TTC ATT CTT TTC TTG CTG G
 AS. 8242-8224, 8231-8213, 8185-8167.
 - n e f 1 遺伝子の特異的配列
 MMMy10: AAA AGA AAA GGG GGG ACT GGA
 S. 9116-9136, 9117-9137, 9062-9082.
 MMMy10bis: TCC AGT CCC CCC TTT TCT TTT
 AS. 9136-9116, 9137-9117, 9082-9062.
 MMMy11: AAA GTC CCC AGC GGA AAG TCC C
 AS. 9503-9483, 9505-9484, 9449-9428.
 - v i f 遺伝子の特異的配列
 MMMy15: GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT GAT
 S. 5073-5099, 5068-5094, 5037-5063.
 MMMy16: GCA GAC CAA CTA ATT CAT CTG TA
 S. 5383-5405, 5378-5400, 5347-5369.
 MMMy16bis: TAC AGA TGA ATT AGT TCG TCT GC
 AS. 5405-5383, 5400-5378, 5369-5347.
 MMMy17: CTT AAG CTC CTC TAA AAG CTC TA

AS. 5675-5653, 5670-5648, 5639-5617.
 - v p u 遺伝子の特異的配列
 MMMy25: GTA AGT AGT ACA TGT AAT GCA ACC T
 S. 6081-6105, 6076-6100, 6045-6069.
 MMMy26: AGC AGA AGA CAG TGG CCA TGA GAG
 S. 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230.
 MMMy27: ACT ACA GAT CAT CAA TAT CCC AA
 AS. 6343-6321, 6338-6316, 6307-6285.

本発明は同様に、上述のリーダの配列に相補的なヌクレオチド構造を有する配列（リーダ）をもその目的としている。

本発明は同様に、配列の上述のような雑種形成特性が変更されることなく、上述のものとの関係においていくつかの突然変異を示すヌクレオチド配列にも関する。そのために本発明の配列の雑種形成特性に影響を与えることなく、上述の配列を構成するヌクレオチドと異なるヌクレオチドの百分率は40%に達しうる。

一般的に言って、センス（S）リーダ（プライマ）の場合において、リーダの3'側に比べ5'側でより多くの突然変異が耐容され、3'側は、配列増幅を可能にするため1つの核配列の一定のストランド（鎖）と完全に雑種形成しなくてはならない。アンチセンス（AS）リーダの場合、3'側で耐容が可能である。

本発明の目的は同様に、上述の雑種形成特性が変更されることなく、一時的変異が中央部分に含まれ、各々の側に5つ以上の塩基の保持を伴う上述のようなリーダにもある。

本発明のオリゴヌクレオチドリーダの特徴の1つは、本発明の中

に記されている技術的な使用上の指示が実施された場合、一般に非特異性帯域の無い明確な增幅帯域を与えるという点にある。これは、雑種形成の特異性を高める27個の塩基に達しうるリーダの長さ、ならびに外乱性会合を除去することのできる徹底的な使用条件によるものである。各タイプのウイルスに対する特異性は、基準マトリクスとの相似性百分率の閾値であると同時に、受話できる収量について40個の塩基に達しうるリーダの長さの閾値もある。

本発明は同様に、1988年8月1日付の欧州特許出願明細書第88/307,102,9号内に記述されているようなDNA又はRNAの多数のコピーの合成によるゲノム増幅方法の利用のためにその末端5'のレベルで1つのプロモータに結びつけられている上述のようなリーダにも拡大される。

本発明は特に、HIV-1及び/又はHIV-2タイプのウイルスによるヒトの潜在的感染又は3つのウイルス（HIV-1, HIV-2, SIV）のうちの少なくとも1つによる動物の潜在的感染の生体外診断に対し応用することのできる、HIV-1及び/又はHIV-2タイプ又はSIVタイプのウイルスの核配列の遺伝子増幅を実施するための上述のリーダの利用をその目的としている。

本発明のこの生体外診断方法は、研究対象の患者から得られた生物学的試料（例えば循環血液の血清、リンパ球といった生物学的液体）を用いて実現され、主として次のような段階を含む：

- 上述の生物学的試料の中に場合によって存在するHIV-1及

び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する検出すべき核酸の抽出段階、及び場合によっては、2本鎖核酸を得るための、この核酸がRNAの形をしている場合の核酸の逆トランスクリプターゼ（逆転写酵素）を用いた処理段階（なおこの後の段階は以下でウイルスRNAのレトロトランスクリプション（逆転写）段階とも呼ばれている）

- 1本鎖核酸の形成に導く、検出すべき2本鎖核酸の変性の段階、

- 以下に定める雑種形成条件の下で本発明に従った少なくとも1つのリーダ対と上記ストランドを接触させることによる、本発明に基づく少なくとも1つのリーダと、上記変性段階の際に得られた核酸鎖の各々との雑種形成の段階

- 1つの重合剤（DNAポリメラーゼ）と異なる4つのヌクレオシド三リン酸（dNTP）が存在する中でリーダが上で雑種形成されるようなストランドと相補性をもつDNAを、これらのリーダから形成し、かくして先行する変性段階に比べさらに多くの2本鎖核酸の形成がもたらされる段階

を含み、かつ場合によって生物学的試料の中にその検出を可能にするだけ充分な割合で存在する検出すべき前記核配列を得るため規定の回数だけくり返されるようなサイクル。

- 生物学的試料内にHIV-1及び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する核酸が場合によって存在することを検出する段階。

上述の雑種形成段階は、以下に組成（最終使用濃度単位）が示さ

れでいる緩衝液「10×バッファ」内で1分30秒間60℃にて有利に実現される。

本発明の生体外診断方法は、ウイルス性RNAを用いて、或いはまたエピゾーム又は組込み型の相補的DNAを用いて実現できる。

実際、HIV及びSIVウイルスのゲノムは、生物内のウイルスの局在化に応じてRNA又はDNAの形で現われる。

ウイルスが生体の細胞内部特に血液細胞内にある場合、そのRNAは、逆トランスクリプターゼによりDNAに再複写される。反対に、特に血液中の細胞外環境内のHIVタイプのウイルスのゲノムは、RNAの形にとどまる。

(クロロホルムフェノールでの従来の方法以外に)当該発明により推奨されている生物学的試料の細胞内に含まれているウイルス性DNAの本発明に従った抽出段階は、以下の段階を含む:

- ・ ポッタ大ピストン内で熱分解された0.5mlの水の中での細胞沈渣の懸濁段階、
- ・ いわゆる「往復運動による」細胞の粉碎段階、
- ・ 最終濃度が0.1%になるような、1対「×100トリトン」の付加段階、
- ・ 100℃で15分乃至25分間の熱による変性段階、
- ・ 細胞残渣のみを除去するための短い遠心分離段階、
- ・ 無水エタノール2.5体積と最終体積の10%の3モルの酢酸ナトリウムの付加による-20℃で一晩中のDNAの沈殿段階。DNAは次に回収され、70℃でエタノールにより2回洗浄された後熱分解水の中に再懸濁させられる。ここでこの方法は

DNAとRNAの同時沈殿を可能にし、従って、「DNA直接PCR」と呼ばれる方法又は「PCR-RNA」と呼ばれる方法の使用によるHIV又はSIVタイプのウイルスのゲノムメッセージの検出が可能となる、ということに留意されたい。

ウイルス性RNAの抽出段階は一般に、当業者にとって従来通りの方法で行なわれる。

RNAの抽出後、そのゲノムがRNAの形をしているHIV-1及び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスを含む生物学的試料を用いて本発明の生体外診断が行なわれる場合、1本鎖のRNAから2本鎖のDNAへの形質転換という補足的段階を実施する必要がある。

RNAからDNAへのこの形質転換は、逆トランスクリプターゼを用いた適当な媒質内での生物学的試料特に血清の抽出後得られたRNAの処理によって実現される。

本発明はさらに限定にいうと、なかでも以下に規定するようなウイルス性RNAの逆転写(レトロトランスクリプション)段階が以下の要領で実施される生体外診断方法をその目的としている:

- 水中に再懸濁された抽出RNA 10μgを最終体積4.0μl内で各々4.0μMの濃度でリーダ対の存在する中に置く。この全体を10分間100℃で変性し次に氷水の中に沈める。
- 上述の「10×バッファ」緩衝液5μl+1単位の逆トランスクリプターゼ[AMV(鳥類の骨髄芽球(細胞)症ウイルス)又はMuMLV(モロニー白血病ウイルス)の]+1単位の

Taq-ポリメラーゼ+各2.5μMの4つのdNTPの混合物1μl+Q.S.P.水1.0μlの混合物1.0μlを加える。従って最終体積は5.0μlとなる。

この反応は次の2段階で行なわれる:

- a) 第1段階: 13分間42℃での逆トランスクリプターゼの作用によるcDNAの製造、
- b) 第2段階: 従来の遺伝子増幅: 逆トランスクリプターゼを破壊し雑種形成解除/雑種形成段階を可能にするため3分間95℃に加热し、次に遺伝子増幅のため前述のサイクルを開始する。

本発明はさらに限定に言って、本発明の単数(又は複数)のリーダ(又はプライマ)対の存在する中で変性段階が行なわれる、前述のような生体外診断方法をその目的としている。実際、上に明記したように、本発明のオリゴヌクレオチド(又はプライマ)の特徴の1つは、以下の条件の下で用いられた場合に、一般に非特異性帯域の無い明確な増幅帯域を与えるという点にある:

- 雜種形成: 変性-再会合の第1段階のためプライマ(各プライマ4.0μM(4.0μM)の溶液1μl)をDNA-マトリクス(100~300ng)が存在する中に置く; 10分間100℃で加热しこのDNA-マトリクスとプライマの混合物を含む試験管を水を含む水の中に沈めてDNA-マトリクス/プライマの再会合率を増大させる。これらのプライマは、0.8μMという次に続く増幅段階における最終濃度で使用されなくてはならない。
- 増幅: 前記媒質内に、各々最終溶液(5.0μl)内で0.5μ

モルで使用される4つのdNTPと、5.0μlの反応媒質に対し1単位のTaq-ポリメラーゼを付加する: この段階は、1/10に希釈した場合、トリス-HCl、pH8.9: 5.0μM: (NH₄)₂SO₄: 1.5μM: MgCl₂: 5μM: β-メルカプトエタノール: 1.0μM: ゼラチン: 0.25mg/μlといった組成をもつ「10×バッファ」という名で一般に呼ばれている本発明の増幅緩衝液の中で実施される。この緩衝液5μlとQ.S.P.水5.0μlを前述の媒質に付加する。

増幅サイクルは次の要領で行なわれる: すなわち、次のもので成る30回~40回のサイクル:

- ・ 1秒間94℃(変性)
- ・ 1分30秒間60℃(雑種形成)
- ・ 1分30秒間78℃(伸長)。

この全体の後には、15分間78℃で唯一回のサイクルが続くことになる。

±0.3℃の誤差で示されている温度の精確さならびに異なるサイクル中のその安定性は、最大収量を得、非特異性帯域が無いようにするための不可欠な条件である。

DNAの最適濃度は、(患者の又は培養でホ乳動物その他の)細胞から抽出されたゲノムDNAについて100乃至300ngである。

当然のことながら、前述の条件は、5.0μlの最終反応媒質に対する最適な条件であり、これらの条件は反応媒質の最終体積に応じて修正されるものである。

本発明の異なるリーダ対（又はリーダ対の組合せ）を複数用いることにより、HIV及び／又はSIVタイプのウイルスの複数タイプの交差検出又は、HIV及び／又はSIVタイプの同一ウイルスの複数の遺伝子の同時検出が可能となる。

例えば、本発明の枠内で使用可能な好ましいリーダ対としては、以下のようなリーダ対を挙げることができる：

- 特にHIV-1及び／又はHIV-2によるヒトの感染の生体外診断のための、MMy1-MMy4、MMy2-MMy4、MMy1-MMy3、MMy18-MMy19、MMy4bis-MMy28bis、MMy28-MMy29bis、MMy29-MMy30bis、MMy31-MMy32bis。
- 特にHIV-1によるヒトの感染の生体外診断のための、MMy5-MMy8、MMy6-MMy8、MMy7-MMy8、MMy5-MMy7bis、MMy6-MMy7bis、MMy9-MMy11、MMy10-MMy11、MMy9-MMy10bis、MMy26-MMy5bis、MMy8bis-MMy9bis、MMy8bis-MMy89、MMy89bis-MMy9bis、MMy15-MMy17、MMy15-MMy16bis、MMy16-MMy17、MMy25-MMy27、MMy26-MMy27。
- HIV-2によるヒトの感染の生体外診断のための、MMy20-MMy22、MMy20-MMy21bis、MMy21-MMy22、MMy23-MMy24、MMy12-MMy14、MMy12-MMy13bis。

このサイクルの伸長段階で用いられる重合剤は、熱安定性のあるDNAポリメラーゼ特にTaqポリメラーゼ、Appligene社のアンブリフィオーゼ又は市販されうる熱安定性あるあらゆるDNAポリメラーゼである。

一般的に言って、本発明の生体外診断方法は30回から40回反

復される。

本発明の生体外診断方法は同様に、使用されるスクレオチドリーダ対に応じて、生物学的試料の中に存在するHIV及び／又はSIVタイプのウイルスの遺伝子を選択的に検出することも可能にする。

本発明の上述の遺伝子毎の診断方法のために一例として用いることのできるリーダ対は以下のようなものである：

- gag遺伝子のためのMMy1-MMy4、MMy2-MMy4、MMy1-MMy3、MMy4bis-MMy28bis、
- vpr遺伝子のためのMMy18-MMy19、
- env遺伝子のためのMMy5-MMy8、MMy6-MMy8、MMy7-MMy8、MMy5-MMy7bis、MMy6-MMy7bis、MMy26-MMy5bis、MMy8bis-MMy9bis、MMy8bis-MMy89、MMy89bis-MMy9bis、
- nef1遺伝子のためのMMy9-MMy11、MMy9-MMy10bis、MMy10-MMy11、
- nef1遺伝子のためのMMy15-MMy17、MMy15-MMy16bis、MMy16-MMy17、
- vif2のためのMMy20-MMy22、MMy20-MMy21bis、MMy21-MMy22、
- vpxのためのMMy23-MMy24、
- nef2のためのMMy12-MMy14、MMy12-MMy13bis、MMy13-MMy14、
- vpu遺伝子のためのMMy25-MMy27、MMy26-MMy27、
- pol遺伝子のためのMMy28-MMy29bis、MMy29-MMy30bis、

表 I

gag : gag :					
:MMy1-MMy3:MMy1-MMy4:MMy2-MMy4:MMy4bis-MMy28bis:					
HIV1-BRU:	265	:	750	:	532
					671
HIV1-MAL:	282	:	785	:	556
					671
HIV1-ELI:	265	:	750	:	538
					674
HIV2-ROD:	354	:	845	:	544
					663
SIV:	343	:	844	:	544
					668

表 II

env : env :					
:MMy5-MMy7bis:MMy5-MMy8:MMy6-MMy7bis:MMy6-MMy8:					
HIV1-BRU:	480	:	953	:	330
					803
HIV1-MAL:	471	:	944	:	321
					794
HIV1-ELI:	471	:	941	:	321
					791
HIV2-ROD:	-	:	-	:	-
					-
SIV:	-	:	-	:	-
					-

表 III

	env	:	env	:
	:MMy7-MMY8:MMY26-MMY5bis:MMY8bis-MMY9bis	:		
HIV1-BRU:	498	:	691	:
	1038	:		
HIV1-MAL:	498	:	691	:
	1041	:		
HIV1-ELI:	495	:	679	:
	1038	:		
HIV2-ROD:	-	:	-	:
	-	:	-	:
SIV:	-	:	-	:
	-	:	-	:

表 IV

	env	:	env	:
	:MMY8bis-MMY89:		MMY89bis-MMY9bis	:
HIV1-BRU:	411	:		646
		:		
HIV1-MAL:	411	:		649
		:		
HIV1-ELI:	411	:		646
		:		
HIV2-ROD:	-	:	-	-
	-	:	-	-
SIV:	-	:	-	-
	-	:	-	-

表 V

	nef1	:	nef1	:
	:MMY9-MMY10bis: MMY9-MMY11: MMY10-MMY11	:		
HIV1-BRU:	293	:	660	:
	388	:		
HIV1-MAL:	302	:	660	:
	388	:		
HIV1-ELI:	296	:	663	:
	388	:		
HIV2-ROD:	-	:	-	:
	-	:	-	:
SIV:	-	:	-	:
	-	:	-	:

表 VI

	nef2	:	nef2	:
	:MMY12-MMY13bis:MMY12-MMY14:MMY13-MMY14	:		
HIV1-BRU:	-	:	-	:
	-	:	-	:
HIV1-MAL:	-	:	-	:
	-	:	-	:
HIV1-ELI:	-	:	-	:
	-	:	-	:
HIV2-ROD:	400	:	792	:
	415	:		
SIV:	400	:	755	:
		:	378	:

表 VII

	vif1	:	vif1	:
	:MMY15-MMY16bis:MMY15-MMY17:MMY16-MMY17	:		
HIV1-BRU:	333	:	603	:
	293	:		
HIV1-MAL:	333	:	603	:
	293	:		
HIV1-ELI:	333	:	603	:
	293	:		
HIV2-ROD:	-	:	-	:
	-	:	-	:
SIV:	-	:	-	:
	-	:	-	:

表 VIII

	vif2	:	vif2	:
	:MMY21-MMY22	:	MMY23-MMY24	:
HIV1-BRU:	-	:	-	:
	-	:	-	:
HIV1-MAL:	-	:	-	:
	-	:	-	:
HIV1-ELI:	-	:	-	:
	-	:	-	:
HIV2-ROD:	329	:		329
		:		
SIV:	326	:		329
		:		

表 X

	vpu	:	pol	:
	:MMy25-MMY27:MMy26-MMY27:		MMy28-MMY29bis	:
HIV1-BRU:	263	:	104	:
			623	:
HIV1-MAL:	263	:	101	:
			584	:
HIV1-ELI:	263	:	101	:
			584	:
HIV2-ROD:	-	:	-	:
			666	:
SIV:	-	:	-	:
			712	:

表 XI

	pol	:	pol	:
	:MMy29-MMY30bis:MMy30-MMY31bis:MMy31-MMY32bis			
HIV1-BRU:	742	:	869	:
			826	:
HIV1-MAL:	742	:	869	:
			826	:
HIV1-ELI:	742	:	869	:
			826	:
HIV2-ROD:	742	:	866	:
			826	:
SIV:	742	:	866	:
			826	:

又は複数の硫黄原子を有するいくつかのヌクレオチドを含む上述のオリゴヌクレオチドにも関する。このようなオリゴヌクレオチドは2重らせんの安定性を増大させ、ひいては増幅すべきDNA鎖とより良く雑種形成するという特徴を呈する。

本発明は同じく、特に「La Vie des Sciences(科学ライフ)」報告書、一般シリーズ、第4巻、No.1、p17-37の中に掲載されたC. Heleneの論文中に記されている方法に従って、発光剤(オレンジアクリジンといった平坦な芳香族分子)が上で共有結合的に移植されているヌクレオチドを含むいわゆる「修正塩基」の形を呈する上述のようなオリゴヌクレオチドにも関する。このようなオリゴヌクレオチドは、特に蛍光により容易に検出可能であるという特徴をもつ。

本発明のオリゴヌクレオチドは同様に、SIVタイプのウイルスによるサル(アカゲザル、マンガベイザル又はサバンサモンキー)の感染の生体外診断方法の実施のためにも使用できる。なおこの方法は上述のもの的主要な特徴を受け継いでいる。

本発明のもう1つの目的は、上述の生体外診断方法の実施のための診断用キットにある。一例を挙げると、本発明の診断用キットには以下のものが含まれる:

- 検出すべき核酸配列のストランドの1つと雑種形成するリーダー及び上述の条件下で上述のストランドの相補ストランドと雑種形成するリーダーを各々含む少なくとも1つの本発明に基づくオリゴヌクレオチドリーダー対、
- 特にDNAポリメラーゼと4つの異なる三リン酸ヌクレオチド

ゲノム上のその配置により、増幅に役立つプライマは、「ザザントラスファ」による分析の際に観察された増幅帯域の特異性を確認するため低温プローブ技術において使用するため、又はキニエーションによる³²Pでの標識づけの後に、プローブとして用いることができるよう、組合せ可能であるということに留意されたい。第3のオリゴヌクレオチドが特異的内部プローブとして役立ちうるようにするための従来のリーダー組合せに加えて、交差検出を可能にするこれらの遺伝子の重複による遺伝子vif1/vpr及びvif2/vpxの特殊なケースにも留意されたい。さらに、増幅されたDNAの配列決定による分析の際に、これらのオリゴヌクレオチドは、各方向における2重配列づけ従って配列の2重読みとりを可能にしかくして場によって起こる解釈のあいまいさを無くするようなDNAポリメラーゼに対し特異的なリーダとして用いることができる。

本発明の目的は同様に、特に放射線又は酵素によって標識づけされた上述のもののようなリーダ、ならびに特に上述のような生体外診断方法の枠内でのヌクレオチドゾンデとしての利用にある。

本発明はまた、 α 立体配座の糖を含む上述のようなオリゴヌクレオチドをもその目的としている。このようなオリゴヌクレオチドは、マトリクスと共に形成された2重らせんの方向を逆転させる特徴をもち(ウイルスのゲノムのストランド)、この2重らせんはかくして「S」状態から「A S」状態に移行する。

本発明は同様に、メチル化され及び/又は特にアデニン上に単数

の増幅作業サイクルの実施に適した試薬、及び上述の「10×バッファ」と呼ばれる反応媒質、

- 検出すべき増幅された単数(又は複数)の核酸配列と特異的に雑種形成することができる、低温プローブ技術又は放射能によって特に標識づけされうる単数(又は複数)のゾンデ。

本発明はまた、これらのリーダを用いて増幅されたヌクレオチド配列によってコード化されたタンパク質の合成方法の実施のための、前述の本発明に基づくリーダの利用にも関する。

一例を挙げると、このタンパク質合成方法は、上述の条件下で本発明に基づく少なくとも1つのリーダ対と配列を接触させることにより(一定のタンパク質についてコード化し場合によってはそのヌクレオチドの或る種の変更を受けた) HIV又はSIVタイプのウイルスのゲノムのヌクレオチド配列を増幅させる段階と、それに続いてこうして増幅されたこれらの配列をタンパク質に翻訳する段階を含んでいる。なおこの後者の段階は、特に、増幅された前記配列を含むベクタを用いて適切な宿主細胞を形質転換し、これらの宿主細胞内で生成されたタンパク質を回収することによって実施される。

本発明は同じく、本発明のヌクレオチド配列(又はリーダー)の翻訳から得られたポリペプチドにも関する。

本発明の目的は、特にエイズ予防活動における抗ウイルス剤全般としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドリーダの利用、ならびに薬学的に受容できる賦形剤と結びつけた形でのこれらのアンチセンスリーダを含む薬剤化合物もある。

本発明は同様に、本発明に基づくヌクレオチド配列の単数又は複数の翻訳生成物及び／又は本発明に従って構成されたリーダから上述の方法に従って増幅されたヌクレオチド配列の単数又は複数の翻訳生成物を含む免疫化合物にも関する。なおこれらの翻訳生成物は、薬学的に受容できる賦形剤に結びつけられている。

本発明は、上述の単数又は複数の翻訳生成物に対して向けられた（換言すると、本発明に従ったヌクレオチド配列の単数又は複数の翻訳生成物又は本発明に従って構成されたリーダを用いて増幅されたヌクレオチド配列の単数又は複数の翻訳生成物と免疫反応を形成することのできる）抗体、ならびに当業者にとって既知の方法に従いHIV-1及び／又はHIV-2タイプのウイルスによるヒトの感染又は3つのウイルス（HIV-1、HIV-2、SIV）のうちの少なくとも1つによる動物の感染の生体外診断方法の実施のためのその利用、に関する。

一例を挙げると、本発明に従ったこのような生体外診断方法は、研究対象の患者から採取した生物学的試料（特に血清）を本発明に基づく抗体と接触させる作業、及び場合によって生物学的試料の中に存在するHIV又はSIVタイプのウイルスの抗原と前記抗体の間に形成された免疫学的複合体を（特に標識づけされた抗免疫グロブリンを用いて）適切なあらゆる方法で検出する作業を含んでいる。

本発明は同様に、本発明に従った抗体及び、場合によっては、HIV又はSIVウイルスの抗原とこれらの抗体の間で形成された免疫反応を立証する適切な試薬を含む、生体外診断用キットをもそ

の目的としている。

本発明は又、上述のポリペプチド特に国際遺伝コードに従い上述のヌクレオチド配列（又はリーダ）に相応するポリペプチドの調製方法において、好ましくはC末端アミノ酸から出発して、必要とされる順の連続するアミノアシル又は適切な順序で複数のアミノアシル残基をすでに含む予め形成されたフラグメントヒアミノアシル、或いは又こうして予め調製された複数のフラグメントを2つずつ連続的に縮合すること、なお、これは順次段階的に接近するようにN末端アミノ酸に至るまで、ペプチド合成において既知の方法に従って行なわれ、特にカルボキシル基の活性化の後ペプチド結合の形成に通常介入しなくてはならない一方のアミン基及び他方のカルボキシル基又はその逆を除くこれらのアミノアシル又はフラグメントが支持する全ての反応基は予め保護しておくことを特徴とする方法にも関する。

例えば、1974年E. Wunschにより編集された「Meuthode der Organischen Chemie」（有機化学の方法）第I 5-I 及びII卷、THIEME, STUTTGART の中でHoubenweylが記した均質溶液ペプチド合成技法又は、R.D. Merrifieldが「固相ペプチド合成 (Solid Phase Peptide Synthesis)」（J. AM. CHEM. SOC., 45, 2149-2154）に記した固相ペプチド合成法を利用することができる。

本発明は同様に、上述のヌクレオチド配列（又はリーダ）の調製方法において、

- DNA... (デオキシリボヌクレアーゼ) Iを用いて上述のHIV又はSIVタイプのウイルスから分離したゲノミック

DNAを保温し、その後EDTAを付加し、フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25/24/1）の混合物次にエーテルでの抽出により精製を行なう段階、

- DTTの存在する中でEcoRIメチラーゼによりこうして抽出されたDNAを処理し、上述のような抽出により精製を行なう段階、
- *E. coli* (大腸菌) のDNAリガーゼとT₄ DNAポリメラーゼの存在する中で4つのデオキシヌクレオチド三リン酸dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを用いてこうして精製されたDNAを保温しその後上述の方法に従って精製する段階、
- こうして得られた核酸を適切なベクターの中でクローニングし適切なプローブを用いて求める核酸を回収する段階、

を含むような方法にも関する。

本発明のヌクレオチド配列の特に有利な調製方法には、以下の段階が含まれる：

- 「Bioorganic Chemistry (生物有機化学)」4: 274-325 (1986年) 内に記されたリン酸亜アミノ酸β-シアノエチルの自動化された方法を用いてDNAを合成する段階、
- こうして得られた核酸を適切なベクター内でクローニングし、適切なプローブでの雑種形成により核酸を回収する段階。

本発明のヌクレオチド配列のもう1つの調製方法は、以下の段階を含んでいる：

- Proc. Natl. Acad. Sci USA (米国国立科学アカデミ会報) 180: 7461-7465 (1983年) に記されている原理

に従った天然ポリペプチドのアミノ酸連鎖と相容性のある配列をもつ、異なる制限部位を端部に備えた化学的に合成したオリゴヌクレオチドの組立て段階、

- こうして得られた核酸を適切なベクター内でクローニングし、適切なプローブとの雑種形成により求める核酸を回収する段階。

国際調査報告

International Application No. PCT/FR 90/00393

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN several classification schemes apply, indicate all:		
According to International Patent Classification (IPC) or to both Patent Classification and IPC		
IPC 5 C07H 21/04, C12Q 1/70, C12Q 1/68, A61K 39/21, G01N 33/569, A61K 39/42, A61K 31/70, C12N 15/49		
II. FIELDS SEARCHED		
International Classification Described:		
Classification System:	Classification System:	
IPC ⁵	C12Q, G01N, C12N	
Description Described other than International Classification (to the extent that such documents are included in the Fields Searched)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Reference to Claim No. ¹³
X, Y	EP, A, 0229701 (CETUS CORPORATION) 22 July 1987 see page 11, lines 44-47; page 12, lines 61-64; page 13, lines 1-7, 31-42; page 14, lines 15-18	1,12-26
X	EP, A, 0272098 (CITY OF HOPE NATIONAL MEDICAL CENTER) 22 June 1988 see the whole document	1,12-26
X	EP, A, 0269445 (CETUS CORPORATION) 1 June 1988 see the whole document	1,12-26
P, X	The Lancet, vol. 2, 16 September 1989, The Lancet Ltd, C.R. Horsburgh, Jr. et al.: "Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody", pages 637-639, see page 638, left-hand column, last paragraph	1,12-26
<small> * Special category of other documents: "A" document relating to the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" document, but a reference to or later the international filing date "C" document which may prove useful as, among claims or as a basis for a claim, or as a reference to another document "D" document relating to an oral disclosure, use, invention or method "E" document published prior to the international filing date but in the priority date claimed "F" document number of the same patent family </small>		
<small> "G" later document presented after the international filing date or priority date and not in conflict with the document, but considered to be of interest "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "I" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "J" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "K" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "L" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "M" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "N" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "O" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "P" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "Q" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "R" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "S" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "T" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "U" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "V" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "W" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest "Z" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be of interest </small>		
IV. CERTIFICATE		
Date of the Actual Commencement of the International Search	Date of Mailing of the International Search Report	
26 September 1990 (26.09.90)	12 March 1991 (12.03.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

Form PCT/ISA/04 (revised 01/01/89)

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT IDENTIFIED FROM THE SECOND SHEET		
Category ¹⁴	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁵	Reference to Claim No. ¹⁶
X	Science, vol. 239, 15 January 1988, C.-Y. Ou et al.: "DNA Amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells", pages 295-297, see table 2	1,12-26
X	The Journal of Infectious Diseases, vol. 158, No. 6, December 1988, M. Rayfield et al.: "Mixed human immunodeficiency virus (HIV) Infection in an individual: Demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction", pages 1170-1176, see table 3	1,12-26
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, April 1989, D.J. Kemp et al.: "Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions", pages 2423-2427, see page 2424, lines 1-23	1,12-26
P, X	Cell, vol. 58, No. 5, 8 September 1989, Cell Press, A. Meyerhans et al.: "Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations", pages 901-910, see page 908, last paragraph	1,12-26
Y	EP, A, 0269520 (INSTITUT PASTEUR) 1 June 1988 see abstract; claims 1-6	1,19,22
Y	WO, A, 88/05440 (INSTITUT PASTEUR) 28 July 1988 see the whole document	1,19,22
Y	WO, A, 87/07906 (INSTITUT PASTEUR) 30 December 1987 see abstract; claims 1-18	1,19,22
Y	WO, A, 87/07300 (WORCESTER FOUNDATION FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY) 3 December 1987 see abstract	22

Form PCT/ISA/04 (revised 01/01/89)

International Application No. PCT/FR 90/00393

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
<input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹⁷ The International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) of the following requests: <input type="checkbox"/> Claim numbers: ..., because they relate to subject matter not required to be searched by the Authority, namely:	
<input type="checkbox"/> Claim numbers: ..., because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements as such an extent that no meaningful international search can be carried out, namely:	
<input type="checkbox"/> Claim numbers: ..., because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sections of PCT Rule 5.4(e)	
<input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKED ¹⁸ The International Searching Authority found multiple inventions in this International Application as follows: See Form PCT/ISA/206 dated 11 January 1991	
<input type="checkbox"/> All requested additional search fees were fully paid by the applicant, this International Search Report covers all inventions claimed at the international filing date. <input type="checkbox"/> As only some of the requested additional search fees were fully paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims of the International Application for which fees were paid, specifically claims:	
<input type="checkbox"/> No requested additional search fees were fully paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claim(s) it is as by claim numbers: 1,12-26 partially and claim 2	
<input type="checkbox"/> As no search fees claims could be accepted without effect justifying an accepted fee, the International Searching Authority did not fully pay the payment of any additional fee. Remarks on fees: <input type="checkbox"/> The author of search fees were compensated by applicant's fee. <input type="checkbox"/> No author accompanied the payment of additional search fees.	

Form PCT/ISA/04 (revised 01/01/89)

国際調査報告

FR 900393
SA 37940

This sheet lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-enclosed International search report. The members are as registered in the European Patent Office (EPO) as of 01/11/90. The European Patent Office is in no way liable for those particular items which are freely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
EP-A- 0229701	22-07-87	AU-A- 6710987 JP-A- 62217161	16-07-87 24-09-87
EP-A- 0272098	22-06-88	None	
EP-A- 0269445	01-06-88	JP-A- 63294800	01-12-88
EP-A- 0269520	01-06-88	AU-B- 601397 AU-A- 6891187 EP-A, B 0239425 EP-A- 0320495 WO-A- 8704459 OA-A- 8468	13-09-90 14-08-87 30-09-87 14-06-89 30-07-87 29-07-88
WO-A- 8805440	28-07-88	FR-A- 2610632 FR-A, B 2614025 AU-A- 1225088 EP-A- 0283127 JP-T- 1502119 OA-A- 8716 ZA-A- 8800310	12-08-88 21-10-88 10-08-88 21-09-88 27-07-89 31-03-89 22-07-88
WO-A- 8707906	30-12-87	AU-A- 7546887 EP-A- 0253701 JP-T- 63503513	12-01-88 20-01-88 22-12-88
WO-A- 8707300	03-12-87	US-A- 4806463 AU-A- 7487787	23-02-89 22-12-87

For more details about this sheet: see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/90

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 13/00		7731-4H
C 12 N 15/33		
C 12 Q 1/68	Z N A A	8114-4B
1/70		8114-4B
// C 07 K 99:00		

優先権主張	②1989年9月20日③フランス(F R)④89/12371
⑤発明者	モンタニエール, リュク フランス国、エフ-92350 ル・ブレシーロバンソン、リュ・ド ウ・マラブリ、21
⑥出願人	インステイチュート・ナショナル ル・ドウ・ラ・サンテ・エ・ド ウ・ラ・ルシエルシエ・メディ カル フランス国、エフ-75654 パリ・セデュ・13、リュー・ドウ・ト ルビヤツク、101

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平4-507043

【公表日】平成4年(1992)12月10日

【年通号数】

【出願番号】特願平2-508911

【国際特許分類第6版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 39/21 ABA

48/00 ADY

C07H 21/04

C07K 14/155

14/16

C12O 1/68

1/70

G01N 33/569

【F I】

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

A61K 39/21 ABA 9284-4C

48/00 ADY 9051-4C

C07H 21/04 B 8615-4C

C07K 14/155 9356-4H

14/16 9356-4H

C12O 1/68 A 7823-4B

1/70 7823-4B

G01N 33/569 H 0276-2J

平成 9年 6月 30

特許庁長官 穂井 亮九 殿

1. 事件の表示

平成 02年特許第 508911号

2. 補正をする者

事実との関係 特許出願人

名 称 インスティチュート・バスカル

名 称 インスティチュート・カシオル・ドゥ・ラ・サンテ・
ニ・ドゥ・ラ・ル・シル・シ・メディカル

3. 代 申 人

住 所 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号
S V A X T S B L

氏 名 弁理士 (7886) 鈴 田 雄
TEL(3602)7212



4. 補正命令のビ付 なし

5. 補正の内容 明細書の発明の詳細な説明及び特許請求の範囲
の各箇

6. 補正の内容

(1.5) 明細書第1.9頁第1行、第3.2頁第3行、第3.2頁第5行の「単数
(又は複数)」を削除する。
(1.6) 明細書第7頁第1.0～1.1行、第3.0頁第2.4行～第3.1頁第1行、第
3.3頁第1～2行、第3.3頁第9行、第3.3頁第6行、第3.3頁第7行、第3.3
頁第9行の「単数又は複数の」を削除する。
(1.7) 伝記書第1.2行、第6頁第1.7行、第6頁第1.8行、第3.6頁第
1行の「連鎖」を「鎖」と補正する。

7. 特許請求の範囲の欄

別紙のとおり。

1. 補正の詳細な説明の欄

(1) 伝記書第7頁第5行、第1.1頁第1.0～1.1行、同第2.0～2.1行、第3
.2頁第1.0行の「につれてコード化」を「をコード」と補正する。
(2) 伝記書第1.2頁第7行の「に対してコード化」を「をコード」と補正する。
(3) 伝記書第1.0頁第2.4行～第1.1頁第1行の「に対してコード化」を「を
コード」と補正する。
(4) 伝記書第3.2頁第7行を「コード化」を「コード」と補正する。
(5) 伝記書第1.6頁第1.0行、第1.6頁第1.5行、第3.1頁第2.0行、第3.1
頁第2.1行(二箇所)の「ストランド」を「鎖」と補正する。
(6) 伝記書第1.1頁第7行(下から1.8行)、第1.4頁第1.8行、第1.5頁第1
.8行の「核配列」を「核配列」と補正する。
(7) 伝記書第1.6頁第1.9行(下から1.8行)、第3.1頁第4行、第3.1頁第2
.0行、第3.1頁第2.1～2.2行、第3.2頁第4行の「離隔形成」を「ハイブリダ
イズ」と補正する。
(8) 伝記書第1.6頁第1.4～1.5行の「離隔形成される」を「ハイブリダイズ
する」と補正する。
(9) 伝記書第7頁第8行、第1.4頁第1.5行、第1.4頁第1.3行、第1.4頁
第2.1行、第1.5頁第2行、第1.6頁第9行、第1.6頁第1.2行、第1.6頁第2.4
行、第1.9頁第8行(二箇所)、第1.9頁第1.7行、第2.0頁第1.2行、第3.3
頁第2.0行、第3.6頁第5行の「離隔形成」を「ハイブリダイゼーション」と補
正する。
(10) 伝記書第3.1頁第9行「修正」を「改変」と補正する。
(11) 伝記書第1.6頁第9行「第1.1」を「第1.2」と補正する。
(12) 伝記書第1.6頁第9行、第3.3頁第1.5行、第3.3頁第2.2行の「従つ
た」を「よろ」と補正する。
(13) 伝記書第1.6頁第1.3行、第2.1頁第2.0行の「重合剤」を「重合化
用物質」と補正する。
(14) 伝記書第3.6頁第1行の「相容性」を「適合性」と補正する。

(別紙)

請求の範囲

1. - HIV-1 Bru, HIV-1 Ma1, HIV-1 El1, HIV-2 ROD及びSIV MACウイルスのenv, vpr及びpol
遺伝子又はHIV-2 ROD及びSIV MACウイルスのenv2, vif2及びvpx遺伝子又はHIV-1 Bru, HIV-1 Ma1及び
HIV-1 El1ウイルスのenv, nef1, vif1及びvpr遺伝子
内に含まれているタクレオチド配列のうちの1つの中に含まれている配列の中
から選ばれていること。
- 又は(特に最も長いリーダーについて)、HIV-1 Bru, 又は
HIV-1 Ma1又はHIV-1 El1又はHIV-2 ROD又は
SIV MACからの単純タクレオチド配列のうちの1つを含むか、又は、こ
れらの配列の相補的タクレオチド配列を含み、末端3'又は5'の側で当該種
類のタクレオチド配列から「はみ出す」相補的タクレオチドがある場合それら
は好ましくは「記HIV-1, HIV-2又はSIV MACタイプのウイルス
の完全配列自体の中に相應する末端3'又は5'の手前に置かれているものと
一致すること。
- 又はこのリーダーの配列が上記のタクレオチド配列の1つと同一でない場合又
はこれらの配列の1つと相補的でない場合、それでもHIV-1 Bru, HIV-1 Ma1, HIV-1 El1
ウイルスからのタクレオチド配列と及び/又は上述のHIV-2 ROD又はSIV MACウイルスからのタクレオチド配列
とハイブリダイズする可能性があること、
を特徴とするタクレオチド配列。

2. My1: TGG CCC CGG MAC AGG GAC
... .T.

S. 636-653, 636-622, 636-653, 839-876,

834-851

My2: GCG CAC CGG GAA AGA AAA A

... .C. .G.

... A ...
S, 854-872, 864-888, 848-872, 1160-1164,
1124-1148

MMy3: TGC CCA TAG AAA ATG TTT TA
... C, T, T ...
AS, 900-881, 916-897, 900-881, 1212-1182,
1176-1157

MMy4: TGC ATG CCT GCT TGA TG
... A ... C, G ...
AS, 1365-1369, 1419-1403, 1385-1369, 1703-1687,
1667-1651

MMy4B: CCT TCC ATG CCT GCT TGA TG
... C ... A ... C, G ...
AS, 1386-1369, 1421-1403, 1388-1362, 1706-1687,
1670-1651

MMy4Bis: CAT CAA GCA GCG ATG CAA AG
... C, G ... T ... G ...
S, 1389-1388, 1403-1421, 1369 1388, 1687-1706,
1661-1670,

MMy28: AGG CCT GCT GGA AAT GTG G
... 6 ...
S, 2021-2039, 2036-2073, 2024-2042, 2326-2349,
2298-2318,

MMy28bis: CCA CAT TTC CAG CAT CCC T
... 6 ...
... C ...
AS, 2036-2021, 2073-2055, 2042-2024, 2349-2329,
2318-2299

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 B_{ru}、HIV-1
M₁、HIV-1 E₁i、HIV-2 R_{OD}及びSIV-MACウイルス
のpol1遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。

3. MMy18: CAT AGA TGG AAC AAC CCC CAG
S, 5500-5610, 5535-5605, 3554-3574,
6233-6296, 6147-6170.

MMy19: TCC ATT TCT TGC TCT CCT CTG T
AS, 5870-5849, 5865-5844, 5834-5813, 6561-6531,
6454-6431,

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 B_{ru}、HIV-1
M₁、HIV-1 E₁i、HIV-2 R_{OD}及びSIV-MACウイルス
のpol1遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。

4. MMy29: TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA
... A ...
S, 2670-2643, 2615-2638, 2584-2607,
2971-2994, 2887-3010

MMy29bis: TGG GGC CAT CCA TTC CTG CCT TAA
... T ...
AS, 2643-2620, 2638-2615, 2607-2584,
2994-2971, 3010-2887.

MMy30: TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AA
... T ...
S, 3330-3361, 3334-3356, 3333-3325, 3630-3712,
3606-3628,

MMy30bis: TTC TGT ATG TCA TTC ACA GTC CA
... T ...
AS, 3361-3389, 3356-3334, 3325-3303,
2712-3690, 3628-3606,

MMy31: CAT GGG TAC CAG GAC ACA AAG G
S, 4186-4207, 4181-4202, 4150-4171, 4634-4566,

4400-4471,

MMy3bis: CCT TTD TGT CCT GGT ACC CAT G
AS, 4207-4185, 4202-4181, 4171-4150,
4355-4334, 4471-4450,

MMy32: TCG AAA GGT GAA GGG GCA G
... A ...
S, 4892-5011, 4987-5006, 4550-4975, 5340-5359,
5256-5275,

MMy32bis: ACT GCG CCT TAA CCG TTC GA
... T ...
... C ...
AS, 5011-4992, 5006-4987, 4975-4956,
5359-5340, 5275-5256

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 B_{ru}、HIV-1
M₁、HIV-1 E₁i、HIV-2 R_{OD}及びSIV-MACウイルス
のpol1遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。

5. MMy17: AGA GAC TGT TGC CCC CCC GTG
S, 9165-9165, 9139-9159,

MMy18: ATA TAC TTA GAA AAG GAA GAA AG
S, 9542-9564, 9516-9538,

MMy19bis: CCT TCT TCC TTT TGT ATG TAT AT
AS, 9564-9542, 9538-9516,

MMy14: AGC TGA GAC AGC AGG AAC TAC TTT TCA
AS, 5956-5933, 9893-9870,

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-2 R_{OD}及びSIV-MACウ
イルスのpol1遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。

6. MMy20: TAT GGA GGA GGA AAA GAG ATG GAT ACT
S, 5424-5450, 5340-5366,

MMy21: TAC CAC TTA TTT CCC TTG CCT T
... A ...

S, 5761-5775, 5670-5691,

MMy21bis: AAA GCA AGG GAA ATA AGT CCT A
AS, 5773-5754, 5691-5670,

MMy22: CCC TTG TTC ATC ATG CAA GAA T
AS, 6082-6061, 5936-5974,

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-2 R_{OD}及びSIV-MACウ
イルスのpol1遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。

7. MMy23: ATG TCA GAT CCC AGG GAG A
S, 5900-5918, 5813-5831,

MMy24: CCT GGA GGG GGA GGA GGA GGA
AS, 6228-6208, 6141-5121,

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-2 R_{OD}及びSIV-MACウ
イルスのpol1遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。

8. MMy5: CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT CCC CG
S, 6505-6530, 6803-6928, 6860-6885

MMy5bis: CGG GCA CAA TAA TGT ATG CCA ATT CG
AS, 6530-6505, 6828-6303, 5895-6860,

MMy6: ATG GGC AGT CTA GCA GAA GAA GA
S, 7055-7077, 7053-7075, 7010-7332

MMy7: ATC CTC AGG AGG CGA CCC AGA AAT T
S, 7360-7384, 7349-7373, 7306-7330

MMy7bis: ATG TTA TGG GTC CCC TGT TGA CGA T
AS, 7384-7360, 7373-7343, 7330-7306

MMy8: GTG CTT CCT CCT CCT CCC AGG AAC CC
AS, 7257-7232, 7346-7321, 7300-7775

MMy8bis: CGG TTC TGT GGA GCA GCA GGA AGG AC
S, 7832-7857, 7821-7846, 7775-7800,

MMy9: ATG GGT GGC AGG TGG TCA AAA ACT AG
... A ...

S, 8844-8839, 8838-8561, 8787-8812,
 My98is: CT₃ CTT TTT GAC CAC TIG CCA CGC AT
 AS, 8869-8844, 8851-8836, 8812-8787,
 My78: TAT TAA CAA GAG ATG GTG G
 S, T629-7647, 7612-7530, 7572-7590,
 My85: CCA GCA AGA AAA GAA TGA A
 S, 8224-8242, 8213-8231, 8167-8185,
 My86is: TTC ATT CTT TTC TIG CGC G
 AS, 8242-8224, 8231-8213, 8185-8167,
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 Bru、HIV-1 Ma1 及びHIV-1 E1+ウイルスのenv遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 9. My10: AAA AGA AAA CGG CGG ACT CGA
 S, 9116-9136, 9117-9137, 9082-9082,
 My10bis: TCC AGT CGC CGC TTT TCT TTT
 AS, 9136-9116, 9137-9117, 9082-9082,
 My11: AAA GTC CGC AGC CGA AGC TCC C
 AS, 9503-9483, 9505-9484, 9449-9428,
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 Bru、HIV-1 Ma1 及びHIV-1 E1+ウイルスのenv遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 10. My15: GAT CAT GGA AAA CAG ATG CGA CGT GAT
 S, 5073-5099, 5068-5094, 5037-5063,
 My16: CGA GAC CAA CTA ATT CAT CTG TA
 S, 5383-5403, 5378-5403, 5347-5369,
 My17is: TAC AGA TGA ATT AGT VEG TCT GC
 AS, 5405-5383, 5400-5378, 5369-5347,
 My17: CTT AAC GTC CTG TAA AAG CTC TA
 AS, 5671-5653, 5670-5648, 5639-5617,

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 Bru、HIV-1 Ma1 及びHIV-1 E1+ウイルスのenv遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 11. My25: GCA AGT ACT ACA TGT AAT CGA ACC T
 S, 6081-6103, 6076-6100, 6045-6069,
 My26: AGG AGA AGA CAG TGG CGA TGA GAG
 S, 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230,
 My27: ACT ACA GAT CAT CAA TAT CGC AA
 AS, 6343-6321, 6358-6316, 6307-6285,
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 Bru、HIV-1 Ma1、HIV-1 E1+、HIV-2 HC0及びSTV-MACウイルスのenv遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 12. 生物学的試料に基づいて行なわれるHIV-1及び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスの核酸配列の遺伝子增幅方法において、上として、
 1. 前述の生物学的試料の中に場合によって存在するHIV-1、HIV-2又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する検出すべき核酸の抽出段階、及び場合によってはこの核酸がRNAの形をしている場合のこの核酸の逆トランスクリプターゼ(逆転写酵素)を用いた処理段階、
 - 一本鎖核酸の形成を導く、検出すべき2本鎖核酸の変性の段階、
 - 少なくとも1つの二重リード対と上記酵素を接触させることによる請求項1～11のいずれか1項記載の少なくとも1つのリードと、上記変性段階の際に得られた寡核酸の各々とのハイブリダイゼーションの段階、
 - 1つのDNAポリメラーゼと異なる4つのヌクレオシド三リン酸(dNTP)の存在する中でリードが上でハイブリダイズするような組と相補性をもつDNAを、これらのリードから形成し、かくして先行する変性段階に比べさらに多くの二本鎖核酸の形成がもたらされる段階
 を含み、かつ場合によって生物学的試料の中にその検出を可能にするだけ充分な割合で存在する検出すべき前記核酸配列を得るため規定の回数だけくり返さ

れるようなサイクル、
 - 生物学的試料中にHIV-1及び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する核酸が場合によって存在することを検出する段階、
 を含む方法。
 1.3. ウイルスDNAの抽出段階には、
 - ポッタスピスジョン内で熱分解された0.5mlの水の中での細胞沈没の蒸留段階、
 - いわゆる「往復運動による」細胞の粉砕段階、
 - 最終濃度が0.1%になるような、1対100×トリトンの付加段階、
 - 100°Cで15分～25分間の熱による脂肪分解、
 - 細胞壁のみを除去するための短い遠心分離段階、
 - 無水エタノール2.5体積と最終体積の10%の3モルの酢酸ナトリウムの付加による-20°Cでの一瞬中のDNAの沈殿段階、
 が含まれることを特徴とする、請求項1記載の方法。
 1.4. ウイルスのRNAの逆転写段階には、
 - 水中に再懸滴された抽出RNA 1.0 μgを最終体積4.0 μl 内で各々0.8 μlの濃度でリード対の存在する中に置き、この全体を10分間100°Cで変性し次に6水の中に沈める段階、
 - 5 μlの「10×バッファ」の緩衝液(1/10³に希釈されたとさトリス-HCl 1, pH=8, 9: 5.0 mM; (NH₄)₂SO₄: 1.5 mM; MgCl₂: 5 mM; β-メルカプトエタノール: 1.0 mM; ゼラチン: 0.25 mg/mlを含む) + 1単位の逆トランスクリプターゼ + 1単位のTaq-ポリメラーゼ+各2.5 mMの4つのdNTPの混合物1 μl + Q. S. P. 水1.0 μl の混合物1.0 μlを用ひ加え(なおcDNAの製造は13分間42°Cで逆トランスクリプターゼの作用により行なわれる)、次に3分間55°Cに加熱して逆トランスクリプターゼを破壊する段階、
 が含まれることを特徴とする、請求項1記載の方法。
 1.5. 变性段階が、請求項1～11のいずれか1項記載のリード対の存在する

中で行なわれることを特徴とする、請求項1～14のいずれか1項記載の方法。
 1.6. - ハイブリダイゼーション: 变性-再会合の第1段階のためプライマー(各プライマー-4.0 μmolの溶液1 μl)をDNAマトリクス(1.0～3.00 ng)が存在する中に置く: 10分間100°Cで加熱してこのDNAマトリクスとプライマの混合物を含む試験管を水を含んだ水の中に沈める。これらのプライマに、0.8 μMという次に統一增幅強度における最終濃度で使用されなくてはならない。
 - 増幅: 前記試験管内に、各々最終濃度(5.0 μl)で0.5 μlで使用される4つのdNTPと、5.0 μlの反応媒質に対し1単位のTaq-ポリメラーゼを付加する: この段階は、「10×バッファ」の名で呼ばれる請求項1～4に組成が示されている増幅緩衝液の中で行なわれる、
 という条件の下で実施されることを特徴とする、請求項1～4記載の方法。
 1.7. HIV-1及び/又はHIV-2タイプのウイルスによるヒトの感染又は3つのウイルス(HIV-1, HIV-2, SIV)の1つ以上による動物の感染の生体外検出用である、請求項1～16のいずれか1項記載の方法。
 1.8. HIV又はSIVタイプウイルスのゲノムのヌクレオチド配列の増幅とそれに続く、請求項1～11のいずれか1項記載のヌクレオチドリードからこれらの増幅された配列をタンパク質に翻訳する作業用の、請求項1～16のいずれか1項記載の方法。
 1.9. 請求項1～11のいずれか1項記載の核酸配列の翻訳生成物及び/又は請求項1～16のいずれか1項記載の方法により、培養されたヌクレオチド配列の翻訳生成物を含む免疫原化物。
 2.0. My48bis-My28bis, My26-My6bis, My8bis-My39, My89bis-My9bis, My25-My27, My26-My27, My28-My29bis, My29-My30bis, My30-My31bis, My31-My32bis、といった、請求項1～16のいずれか1項記載の方法筋のオリゴヌクレオチドリード対。

2.1. - 請求項1～11又は2.0のいずれか1項記載の、少なくとも1対のオリゴヌクレオチドリード対。

- 特にDNAポリメラーゼと4つの異なるミリン酸ヌクレオチドの増幅作業サ
イクルの実施に適した試薬、
- 請求項14に記されているような「10×バッファ」緩衝液、
- 増幅すべき培養された核酸配列とハイブリダイスすることのできる、標識づ
け可能なプローブ、
を含む、請求項12～16のいずれか1項記載の方法の使用のためのキット。

2.2. 理学的に受容可能な遮蔽剤と結びつけた状態で請求項1～11のいずれか1項記載のアンチセンスヌクレオチド配列を少なくとも1つ含む、ウイルス性疾患特にエイズの治療のための組成物、

2.3. 請求項1～11のいずれか1項記載の核酸配列の翻訳生成物及び／又は請求項12～16のいずれか1項記載の方法により増幅されたヌクレオチド配列の翻訳生成物と免疫反応を起こし得る抗体、

2.4. 請求項2.3記載の抗体と研究対象の患者から採取した生物学的試料(特に血清)との接触、及び場合によってこの生物学的試料の中にあるHIV又
はSIVタイプのウイルスの抗原と前記抗体の間で形成された免疫学的複合体の
検出を含む、3つのウイルス(HIV-1、HIV-2、SIV)のうちの少なくとも1つによる動物の感染又はHIV-1及び／又はHIV-2タイプのウ
イルスによるヒトの感染を「生体外」で診断する方法、

2.5. 請求項2.3記載の抗体及び場合によってはこれらの抗体とHIV及び／
又はSIVウイルスの抗原の間で起こった免疫学的反応を実行するのに適した試
薬を含む、請求項2.4記載の方法の使用のためのキット。

2.6. 1/10に希釈されたとき、

- トリス-HCl 1、pH 8.9; 50 mM;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 15 mM
- MgCl_2 ; 5 mM
- β -メルカプト-エタノール; 10 mM
- ゼラチン; 0.25 mg/ml

を含むことを特徴とする、請求項12記載の方法のハイブリダイゼーション液
又は請求項14記載の方法のウイルスRNAの逆転写液において使用可能な組